

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2005年10月6日 (06.10.2005)

PCT

(10)国際公開番号
WO 2005/092082 A1

- (51)国際特許分類⁷: A01H 1/00, C12N 15/84
(21)国際出願番号: PCT/JP2005/005592
(22)国際出願日: 2005年3月25日 (25.03.2005)
(25)国際出願の言語: 日本語
(26)国際公開の言語: 日本語
(30)優先権データ:
特願2004-090639 2004年3月25日 (25.03.2004) JP
(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人 農業生物資源研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL SCIENCES) [JP/JP]; 〒3058602 茨城県つくば市観音台2-1-2 Ibaraki (JP).
(72)発明者; および
(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 土岐 精一 (TOKI, Seiichi) [JP/JP]; 〒3058602 茨城県つくば市観音台2-1-2 独立行政法人 農業生物資源研究所内 Ibaraki (JP).
(74)代理人: 山本 秀策, 外(YAMAMOTO, Shusaku et al.); 〒5406015 大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号 クリスタルタワー15階 Osaka (JP).
- (81)指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
(84)指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

WO 2005/092082 A1

(54) Title: METHOD OF TRANSFORMING MONOCOTYLEDONOUS SEED

(54)発明の名称: 単子葉植物の種子の形質転換法

(57) Abstract: A method of transforming a monocotyledon by means of agrobacterium. There is provided a method of transforming a monocotyledon by means of agrobacterium containing a desired recombinant gene. This transforming method comprises the steps of sowing a culture medium containing a plant growth factor with a monocotyledonous seed, conducting culturing for 1 to 3 days so as to effect germination and infecting the seed with agrobacterium. This method makes it feasible to rapidly transform monocotyledons including rice plant.

(57)要約: 単子葉植物のアグロバクテリウムを介する形質転換法を提供すること。 所望の組換え遺伝子を含むアグロバクテリウムを介して、単子葉植物を形質転換する方法が提供される。この形質転換方法では、単子葉植物の種子を植物成長因子を含む培地に播種後1~3日間前培養して発芽させた後、その種子をアグロバクテリウムによって感染させる工程を包含する。この方法によって、イネを含む単子葉植物を迅速に形質転換することが可能となる。

明 細 書

单子葉植物の種子の形質転換法

技術分野

[0001] 本発明は、单子葉植物の種子のアグロバクテリウムを介した形質転換方法に関する。

背景技術

[0002] 植物を改良するための手段の1つとして「形質転換法」が挙げられ、形質を改変するための所望の組換え遺伝子が植物に導入される。効率の良い、迅速な形質転換法は、有用な植物、特に、主食として重要な食糧である穀物を、分子育種するにおいて極めて重要である。

[0003] 穀物の多く(例えば、イネ、コムギ、オオムギ、およびトウモロコシ)は、单子葉植物に分類される。单子葉植物を形質転換するために、これまでに種々の形質転換法が開発されている。形質転換法は、直接的な形質転換法と間接的な形質転換法とに大きく分けられる。

[0004] 直接的な形質転換法としては、例えば、エレクトロポレーション法[非特許文献1および2]、パーティクルガン法[非特許文献3]ならびにポリエチレングリコール(PEG)法[非特許文献4]が挙げられる。エレクトロポレーション法およびパーティクルガン法は、遺伝子を比較的効率良く導入し得る方法として、单子葉植物を形質転換するために一般に使用されてきた。

[0005] 間接的な形質転換法としては、アグロバクテリウムを介した形質転換法(以下、アグロバクテリウム形質転換法と呼ぶことがある)が挙げられる。アグロバクテリウムは、植物病原細菌の一種である。アグロバクテリウムは、植物に感染すると、自らが有するプラスミド(例えば、TiプラスミドまたはRiプラスミド)上に存在するT-DNA領域を、植物に組込む性質を有する。アグロバクテリウム形質転換法では、植物に遺伝子を導入するための手段として、このT-DNA領域の植物への組込みを利用する。簡潔には、植物は、所望の組換え遺伝子含むアグロバクテリウムで感染される。感染後、所望の組換え遺伝子は、アグロバクテリウムから植物細胞内に移入され、そして植物ゲ

ノムに組込まれる。

- [0006] アグロバクテリウム形質転換法は、双子葉植物については、十分に確立されており、現在までに、所望の組換え遺伝子を発現する安定な形質転換植物が数多く作出されている。
- [0007] 対照的に、アグロバクテリウム形質転換法を单子葉植物に適用することは、従来、一般に困難であるとされてきた。例えば、Portrykusら[非特許文献5]は、アグロバクテリウムは、单子葉植物に感染しないと報告している。しかし、他方で、アグロバクテリウムを使用して单子葉植物を形質転換する試みは数多く行われ、その結果、アグロバクテリウム形質転換法を单子葉植物に適用できる可能性が見出されてきた。
- [0008] 例え、Raineriらは、イネの胚盤部分を取り出し、傷をつけて、脱分化を誘導する培地に置床し、数日後に、その胚盤部分をアグロバクテリウムで感染した。その結果、正常な再分化個体を得るまでには至らなかつたものの、外来遺伝子が導入されたカルスを誘導することに成功した[非特許文献6]。
- [0009] 特許2649287号は、イネおよびトウモロコシについての、アグロバクテリウム形質転換法を開示する[特許文献1]。この方法では、アグロバクテリウムで形質転換するための植物試料として、脱分化した培養組織(例え、カルス)を使用することを必要とする。このため、アグロバクテリウムでの感染の前に、形質転換しようとする植物試料(例え、葉切片)から脱分化された培養組織を作製するために、通常、3~4週間の脱分化誘導期間を必要とする。
- [0010] 特許3141084号に開示される单子葉植物の形質転換方法は、2, 4-Dを含む培地に播種後4~5日間前培養して発芽させた発芽種子を用いる方法である[特許文献2]。特許文献2に開示される形質転換方法は、特許文献1に記載される形質転換方法よりも短時間で单子葉植物の形質転換を行なうことができる点で、優れた方法であるが、依然として、アグロバクテリウムの感染前に、4~5日間程度の前培養が必須であると考えられていた。
- [0011] 上記のように、従来技術におけるアグロバクテリウムを介する单子葉植物の形質転換においては、アグロバクテリウムを感染させることができる植物組織・植物細胞の調製(例え、单子葉植物細胞のカルス化)に長時間費やす必要があった。そのため、

単子葉植物細胞の分子育種の効率化においては、その調製のために時間が障害となっていた。そのため、形質転換に必要な時間を短縮することは、分子育種の実用化においては、非常に重要である。

[0012] 従って、従来法よりも迅速に植物細胞を形質転換する方法の確立が望まれている。

特許文献1:特許2649287号

特許文献2:特許3141084号

非特許文献1:Shimamoto K. ら、Nature、338:274–276、1989

非特許文献2:Rhodes C. A. ら、Science、240:204–207、1989

非特許文献3:Christou P. ら、Bio／Technology 9:957–962、1991

非特許文献4:Datta, S. K. ら、Bio／Technology, 8:736–740, 1990

非特許文献5:Portrykusら、BIO／TECHNOLOGY, 535–542, 1990

非特許文献6:Raineri, D. M. ら、Bio／Technology, 8:33–38, 1990

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0013] 本発明は、上記課題の解決を意図するものである。本発明の目的は、単子葉植物のアグロバクテリウム形質転換法を改良し、従来法よりも迅速な形質転換方法を提供することにある。本発明の方法によれば、従来のアグロバクテリウム形質転換法よりも効率良く、はるかに迅速に、形質転換植物を作出することが可能である。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者らは、従来の知見に反して、植物成長因子存在下で1～3日間培養した単子葉植物の種子に対して、アグロバクテリウムを介した形質転換が可能であることを見出すことによって、本発明を完成した。

[0015] 従って、本発明は以下を提供する。

1. 単子葉植物の形質転換方法であって、所望の組換え遺伝子を含むアグロバクテリウムで、単子葉植物の種子を感染する工程を包含し、ここで、該種子は植物成長因子を含む培地に播種後1～3日間前培養して発芽させた発芽種子である、方法。
2. 前記種子が無傷の種子である、項目1に記載の方法。
3. 前記植物成長因子がオーキシンである、項目1に記載の方法。

4. 前記植物成長因子が2, 4-Dである、項目1に記載の方法。
5. 前記単子葉植物が、イネ科植物である、項目1に記載の方法。
6. 前記イネ科植物が、イネである、項目5に記載の方法。

[0016] 本発明は、単子葉植物の形質転換方法に関し、所望の組換え遺伝子を含むアグロバクテリウムで、無傷の種子を感染する工程を包含する。本発明の方法において、種子は、無傷の状態で感染され、形質転換しようとする植物試料のカルスを調製するなどの処理は必要とされない。

[0017] アグロバクテリウムでの感染に供される種子は、播種後1～3日目の種子であり得る。また、感染の時点で、種子は、発芽した状態であり得る。

[0018] 形質転換される単子葉植物は、好ましくはイネ科植物であり、より好ましくはイネ(*Oryza sativa L.*)である。イネは、インディカ種であっても、ジャポニカ種であってもよい。

発明の効果

[0019] 本発明によれば、改良された、アグロバクテリウムを介した単子葉植物の形質転換方法が提供される。本発明の方法においては、形質転換を意図される植物の無傷の種子が、所望の組換え遺伝子を含むアグロバクテリウムで感染される。本発明の使用により、より効率良く、そしてより迅速に、形質転換植物を作出することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]図1は、本発明の実施例1において使用したバイナリーベクターpCAMBIA1390-sGFPの構造を示す模式図である。

[図2]図2は、1日間の前培養を行った無傷の種子を用いて形質転換を行った結果得られた形質転換体を示す写真である。(上段:選抜7日目、中段:選抜14日目、下段:再分化14日目)

[図3]図3は、2日間の前培養を行った無傷の種子を用いて形質転換を行った結果得られた形質転換体を示す写真である。(上段:選抜7日目、中段:選抜14日目、下段:再分化14日目)

[図4]図4は、3日間の前培養を行った無傷の種子を用いて形質転換を行った結果得られた形質転換体を示す写真である。(上段:選抜7日目、中段:選抜14日目、下段:

(再分化20日目)

[図5]図5Aおよび5Bは、選抜6日目(図5A)および13日目(図5B)における、前培養日数とGFP発現組織出現率(図中のGFP発現率)との関係、および前培養日数と薬剤存在下で増殖可能な組織の出現率(図中の増殖率)との関係をまとめたグラフである。図5Cは、前培養日数と再分化植物体が得られる割合との関係をまとめたグラフである。

[図6]図6は、サザンハイブリダイゼーションに用いたプローブを示す図である。

発明を実施するための最良の形態

[0021] 以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書(定義を含めて)が優先する。

[0022] (用語の定義)

以下に本明細書において特に使用される用語の定義を列挙する。

[0023] 本明細書において使用する場合、「植物成長因子」とは、植物細胞の成長を促進する因子をいう。植物成長因子としては、オーキシン、ジベレリン、サイトカイニン、および他の植物ホルモンが挙げられるが、これらに限定されない。オーキシンとしては、2, 4-D、インドール酢酸(IAA)が挙げられるが、これらに限定されない。

[0024] 本発明の方法が適用される「植物」は、单子葉植物である。好ましい单子葉植物としては、イネ科植物(例えば、イネおよびトウモロコシ)が挙げられる。本発明の方法が適用される最も好ましい植物は、イネであり、特に、ジャポニカイネである。また「植物」は、特に他で示さない限り、植物体、および植物体から得られる種子を意味する。

[0025] (植物発現用ベクターの作製)

单子葉植物に所望の組換え遺伝子を導入するために、所望の組換え遺伝子を含む適切な植物発現用ベクターが構築される。このような植物発現用ベクターは、当業

者に周知の遺伝子組換え技術を用いて作製され得る。アグロバクテリウム形質転換法において使用するための植物発現用ベクターの構築には、例えば、pBI系またはpPZP系のベクターが好適に用いられるが、これらに限定されない。

- [0026] 「所望の組換え遺伝子」は、植物に導入されることが所望される任意のポリヌクレオチドをいう。本発明における所望の組換え遺伝子は、天然から単離されたものに限定されず、合成ポリヌクレオチドも含み得る。合成ポリヌクレオチドは、例えば、配列が公知の遺伝子を、当業者に周知の手法によって合成または改変することにより入手し得る。本発明における所望の組換え遺伝子としては、例えば、形質転換される植物において発現が所望される、その植物に対して内因性または外因性である任意のポリヌクレオチド、および植物においてある内因性遺伝子の発現制御が所望される場合の、その標的となる遺伝子のアンチセンス配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。
- [0027] 植物において発現が意図される場合、所望の組換え遺伝子は、自己のプロモーター(すなわち、天然において該遺伝子が作動可能に連結しているプロモーター)を作動可能な様式で含むか、または自己のプロモーターを含まない場合もしくは自己のプロモーター以外のプロモーターをさらに含むことが所望される場合、任意の適切なプロモーターと作動可能に連結される。使用され得るプロモーターとしては、構成的プロモーター、および植物体の一部において選択的に発現するプロモーター、ならびに誘導性のプロモーターが挙げられる。
- [0028] 植物発現用ベクターにおいて、さらに種々の調節エレメントが宿主植物の細胞中で作動し得る状態で連結され得る。調節エレメントは、好適には、選抜マーカー遺伝子、植物プロモーター、ターミネーター、およびエンハンサーを含み得る。使用される植物発現用ベクターのタイプおよび調節エレメントの種類が、形質転換の目的に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。
- [0029] 「選抜マーカー遺伝子」は、形質転換植物の選抜を容易にするために使用され得る。ハイグロマイシン耐性を付与するためのハイグロマイシンfosフォトランスフェラーゼ(HPT)遺伝子、およびカナマイシン耐性を付与するためのネオマイシンfos fosトランスフェラーゼII(NPTII)遺伝子、およびビアラフォス耐性を付与するための

フォスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ(PAT)遺伝子のような薬剤耐性遺伝子が好適に用いられ得るが、これらに限定されない。

- [0030] 「植物プロモーター」は、選抜マーカー遺伝子に作動可能に連結される、植物で発現するプロモーターを意味する。このようなプロモーターの例としては、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモーター、およびノパリン合成酵素のプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。
- [0031] 「ターミネーター」は、遺伝子のタンパク質をコードする領域の下流に位置し、DNAがmRNAに転写される際の転写の終結、およびポリA配列の付加に関する配列である。ターミネーターの例としては、CaMV35Sターミネーター、およびノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター(Tnos)が挙げられるが、これらに限定されない。
- [0032] 「エンハンサー」は、目的遺伝子の発現効率を高めるために用いられ得る。エンハンサーとしては、CaMV35Sプロモーター内の上流側の配列を含むエンハンサー領域が好適である。エンハンサーは、1つの植物発現用ベクターあたり複数個用いられ得る。

(植物の形質転換)

単子葉植物の形質転換に用いられるアグロバクテリウムは、任意のアグロバクテリウム属細菌であり得、好ましくはAgrobacterium tumefaciensである。アグロバクテリウムは、所望の組換え遺伝子を含む植物発現用ベクターで(例えば、エレクトロポレーションによって)形質転換される。形質転換されたアグロバクテリウムで種子を感染することにより、所望の組換え遺伝子を植物に導入し得る。導入された組換え遺伝子は、植物中のゲノムに組み込まれて存在する。なお、植物中のゲノムとは、核染色体のみならず、植物細胞中の各種オルガネラ(例えば、ミトコンドリア、葉緑体など)に含まれるゲノムを含んでいう。

- [0033] 形質転換が意図される植物の種子は、糊殻を除去した後、無傷の状態で前培養される。種子に関して「無傷」とは、種子が、胚珠を除去すること、および胚盤を傷つけることなどの人為的な操作を受けていない状態であることをいう。
- [0034] 前培養において、種子は、適切な濃度のオーキシン(例えば、2, 4-D)を含む培地(例えば、N6D培地)に播種されて、代表的には1日～3日間、保温され得る。この

ときの温度は、代表的には25～35℃、好ましくは27～32℃である。前培養の完了後、種子は殺菌され、次いで水で十分に洗浄される。次いで、種子は、無菌操作下で、形質転換されたアグロバクテリウムで感染され得る。

- [0035] アグロバクテリウムでの感染(共存培養)の間、種子は、暗黒下で、代表的には2日間～5日間、好ましくは3日間、保温される。このときの温度は、代表的には26～28℃、好ましくは28℃である。次いで、種子は、培地中のアグロバクテリウムを除菌するために、適切な除菌剤(例えば、カルベニシリン、クラフォラン)による処理に供される。形質転換された種子が、選抜マーカー(例えば、ハイグロマイシン耐性などの薬剤耐性)を基準として選抜される。
- [0036] 適切な除菌条件および選抜条件下での培養後、選抜された形質転換種子は、適切な植物調節物質を含む再分化培地(例えば、MS培地)に移され、適切な期間、保温され得る。植物体を再生するためには、再分化した形質転換体は、発根培地(例えば、植物調節物質を含まないMS培地)に移される。根の発育が確認された後、形質転換体は、鉢上げされ得る。
- [0037] 植物に導入された所望の組換え遺伝子は、植物において意図される目的(例えば、目的とされる新たな形質の発現、またはある内因性の遺伝子の発現の制御)のために作用し得る。
- [0038] 所望の組換え遺伝子が植物に導入されたか否かは、当業者に周知の手法を用いて、確認され得る。この確認は、例えば、ノーザンプロット解析を用いて行い得る。具体的には、再生した植物の葉から全RNAを抽出し、変性アガロースでの電気泳動の後、適切なメンプランにプロットする。このプロットに、導入遺伝子の一部分と相補的な標識したRNAプローブをハイブリダイズさせることにより、目的の遺伝子のmRNAを検出し得る。あるいは、所望の組換え遺伝子の導入によって、植物における内因性遺伝子の発現制御が所望される場合、標的となる内因性遺伝子の発現を、例えば、上記のノーザンプロット解析を用いて、試験し得る。標的となる内因性遺伝子の発現が、非形質転換のコントロール植物におけるその発現に比べて有意に抑制されている場合、所望の組換え遺伝子は植物に導入され、そして発現の制御に作用したことが確認される。

[0039] 従来の方法は、アグロバクテリウムでの感染の前に、通常、3～4週間の脱分化誘導期間を必要とする。対照的に、本発明の方法は、脱分化を誘導する工程を必要としないので、形質転換単子葉植物を作出するために必要な日数を短縮することが可能である。さらに、本発明の方法によれば、従来法における選抜に要する期間を短縮することも可能となり、培養変異の影響を低減することが可能となる。

[0040] 本発明の方法の好ましい1つの実施態様において、形質転換単子葉植物を作出するために必要とされる日数は約32日であり、従来のアグロバクテリウム形質転換方法(例えば、下記実施例2を参照)において必要とされる日数(約90日)の約3分の1程度である。また、本発明の方法によれば、日本晴の種子の場合で、10～15%の形質転換効率が得られる。どんとこい、キタアケなどの他のイネ品種でも同程度に高い形質転換効率が達成可能である。従って、本発明の方法を使用することによって、従来の形質転換法よりも効率良く、および迅速に、形質転換植物を作出することが可能である。

[0041] 以下に実施例等により本発明を詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例

[0042] 以下に実施例を挙げて、本発明を具体的に説明する。この実施例は、本発明を限定するものではない。実施例で使用した、材料、試薬などは、他に特定のない限り、商業的な供給源から入手可能である。

(実施例1:本発明の方法によるイネ植物の形質転換)

(材料)

ジャポニカ品種である日本晴を材料に以下の方法によって形質転換を行った。

[0043] (種子の滅菌)

70%エタノールで30秒、続けて2.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液で20分間滅菌した後、滅菌水で洗浄した。

[0044] (ベクター)

形質転換細胞を選抜するマーカー遺伝子であるハイグロマイシン耐性遺伝子と、形質転換細胞のレポーターとなるGFP(Green Fluorescent Protein)遺伝子をT-

DNA上に有するバイナリーベクターpCAMBIA1390-sGFP(図1)をAgrobacterium tumefaciens EHA105菌に形質転換し実験に用いた。

[0045] (アグロバクテリウムを感染させるイネ種子の前培養)

滅菌したイネの種子を、2, 4-Dを含むN6D培地(Toki, Plant Molecular Biology Report, 15(1)(1997))に置床し、30°C明条件下で1～3日間前培養しアグロバクテリウムによる感染に供した。N6D培地の組成は、以下のとおりである:30g／1スクロース、0. 3g／1カザミノ酸、2. 8g／1プロリン、2mg／1 2, 4-D、4g／1ゲルライト、pH5. 8。

[0046] (アグロバクテリウムの感染)

上記の様に1～5日間前培養したイネ種子をそのままアグロバクテリウム菌液に浸せきした後、2N6-AS培地(Hieiら、The Plant Journal(1994)6(2)、271-282)に移植し、暗黒下28°Cで共存培養を行った。2N6-AS培地の組成は、以下のとおりである:N6の無機塩類及びビタミン類(Chu C. C. 1978; Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Science Press Peking, pp. 43-50)、1g／1カザミノ酸、2mg／1 2, 4-D、30g／1ショ糖、2g／1ゲルライト、アセトシリソゴン20mg／ml)。なお、アセトシリソゴンは、10～40mg／mlの濃度を用いた場合でも、同様の結果が得られた。

[0047] (除菌及び形質転換カルスの選抜)

共存培養の完了後、500 mg／1カルベニシリンを含有するN6D液体培地を用いてアグロバクテリウムを前培養した種子から洗い流した。次いで形質転換した細胞を選抜するために形質転換処理種子を薬剤として50 mg／1ハイグロマイシン及び500 mg／1カルベニシリンを含有するN6D培地(選抜培地)に置床した。選抜培地上における形質転換細胞の出現は、置床後のカルスの出現および増殖、ならびにレポーター遺伝子GFPの発現を指標に評価した。

(形質転換体の再分化)

選抜培地に置床後2週間目に、選抜培地上で増殖の見られたカルスを再分化培地(Toki 1997)に移植した。再分化培地の組成は、以下のとおりである:(カルベニシリン(500mg／l)およびハイグロマイシン(50mg／l)を補充したMS培地(30g／1スク

ロース、30g／1ソルビトール、2g／1カザミノ酸、2mg／1カイネチン、0.02mg／1 NAA、4g／1ゲルライト、pH5.7)。

(鉢上げ)

再分化した形質転換体を、発根培地(ハイグロマイシン(25mg／l)を補充した、ホルモンを含まないMS培地)上に移して、根の発育を確認した後に、鉢上げした。

(再生植物体を用いたサザン分析)

得られた再生植物体及び非形質転換植物体の葉からゲノムDNAを抽出し、EcoRIで消化した後、図6に示されるXmnIプローブ(1.4kb)及びsGFPプローブ(1.4kb)を混合して調製した標識プローブを用いて、サザンプロットを行った。サザンプロットは、常法(Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版, Maniatisら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に従って行った。その結果、染色体にプラスミドDNAが挿入されたことが、示された。

(結果)

播種後、1日間、2日間、および3日間前培養し、薬剤(ハイグロマイシン)選抜の7日目、および14日目、ならびに再分化培地へ移してから14日目の組織を観察した。その結果を、図2～4に示す。各図の左側のパネルは、GFPの蛍光を観察した結果を示す。また、各図の右側のパネルは、自然光下で観察した組織を示す。これらの結果から明らかなように、播種後、1日間、2日間、および3日間前培養した無傷の種子のいずれを用いた場合であっても、GFPを発現し、かつ薬剤に耐性な組織が得られた(上段および中段)。さらに、再分化培地での培養の結果、再分化植物体が得られた(下段)。この結果は、1～3日間の前培養をした無傷の種子がアグロバクテリウムによって感染され、外来遺伝子がその種子の細胞内に導入されたことを示す。

[0048] 実施例1の結果を、前培養日数とGFP発現組織出現率との関係、および前培養日数と薬剤存在下で増殖可能な組織の出現率との関係をまとめた結果を図5AおよびBに示す。図5の結果から、1日間の前培養においても、GFPを発現する組織、および薬剤存在下で増殖し得る組織は出現するが、その出現する割合は、前培養日数の増加とともに増加することが示された。

[0049] 形質転換し、ハイグロマイシン耐性となった組織を、再分化させたところ、1日間の

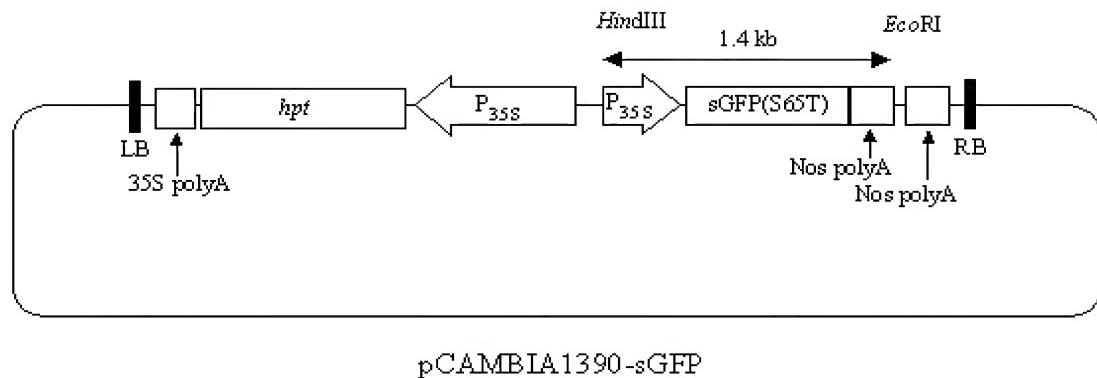
前培養の場合は2クローン(再分化率1. 7%)、2日間の前培養の場合は11クローン(再分化率10. 5%)、3日間の前培養の場合は44クローン(再分化率38. 6%)が再分化した。この結果は、1ー3日間前培養した無傷の種子を用いることによって、植物体に再分化する形質転換体が得られたことを示す。

- [0050] 前培養日数と再分化植物体が得られる割合との関係をまとめた結果を図5Cに示す。図5の結果から、1日間の前培養においても、再分化植物体が得られるが、その出現する割合は、前培養日数の増加とともに増加することが示された。
- [0051] さらに、再分化植物体の葉を用いてサザンプロットを行ったところ、外來遺伝子が植物細胞の染色体に挿入されていることが確認された。
- [0052] 従って、本発明の方法を用いることによって、植物の迅速な形質転換が可能になった。

請求の範囲

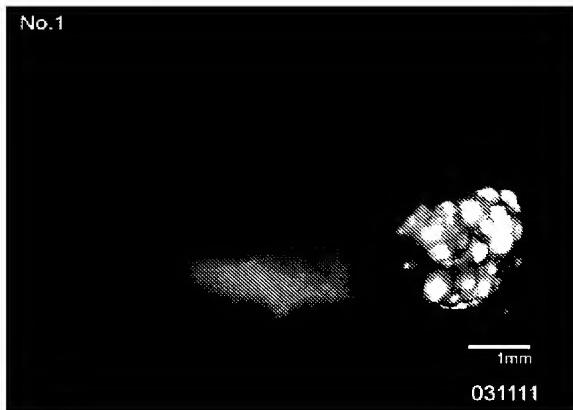
- [1] 単子葉植物の形質転換方法であつて、所望の組換え遺伝子を含むアグロバクテリウムで、単子葉植物の種子を感染する工程を包含し、ここで、該種子は植物成長因子を含む培地に播種後1～3日間前培養して発芽させた発芽種子である、方法。
- [2] 前記種子が無傷の種子である、請求項1に記載の方法。
- [3] 前記植物成長因子がオーキシンである、請求項1に記載の方法。
- [4] 前記植物成長因子が2, 4-Dである、請求項1に記載の方法。
- [5] 前記単子葉植物が、イネ科植物である、請求項1に記載の方法。
- [6] 前記イネ科植物が、イネである、請求項5に記載の方法。

[図1]

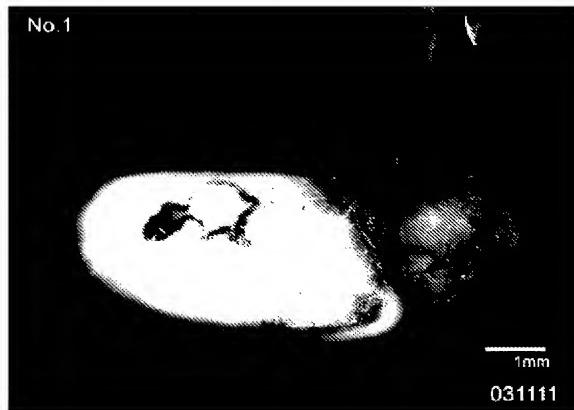


[図2]

選抜 7 日目 GFP 蛍光の写真



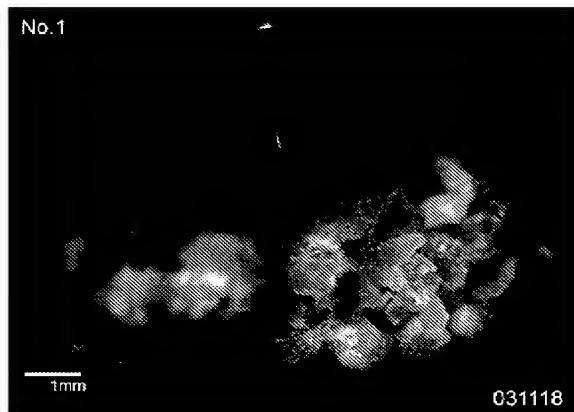
選抜 7 日目の種子の様子



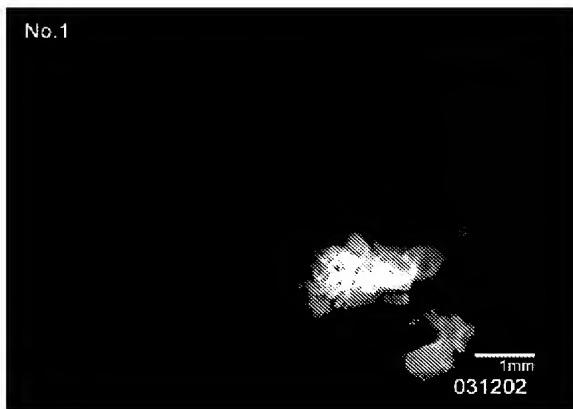
選抜 14 日目 GFP 荧光の写真



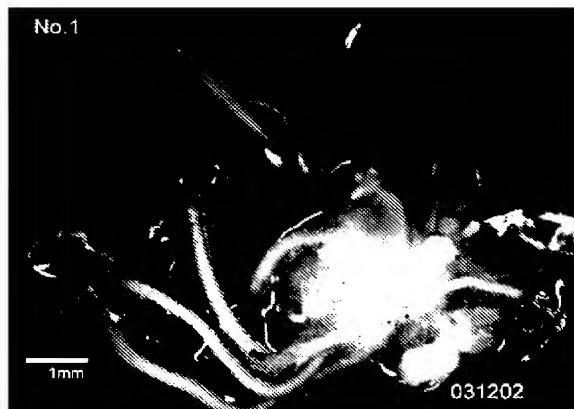
選抜 14 日目の種子の様子



再分化 14 日目 GFP 荧光の写真

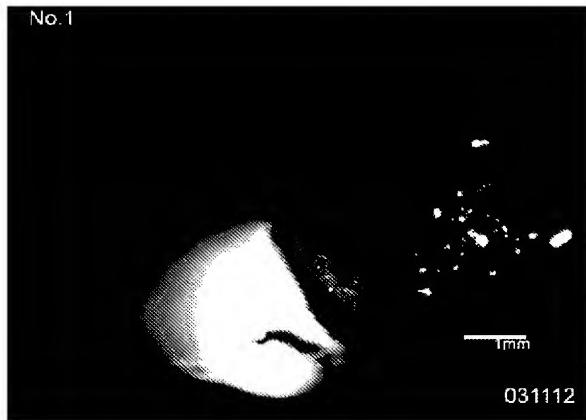


再分化 14 日目の種子の様子

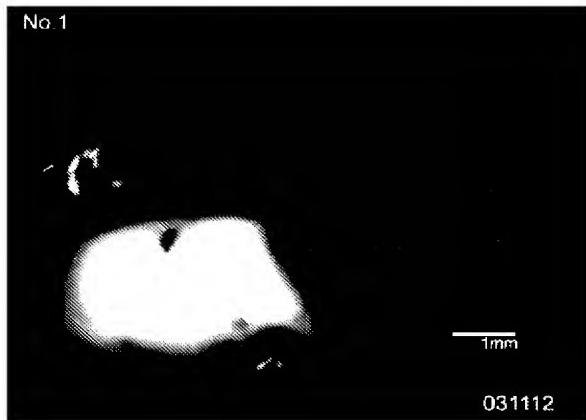


[図3]

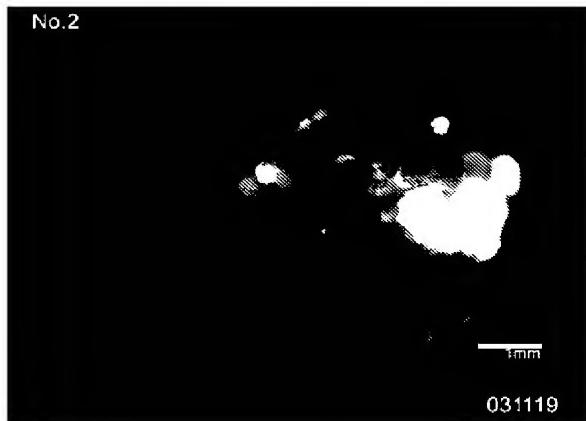
選抜 7 日目 G F P 蛍光の写真



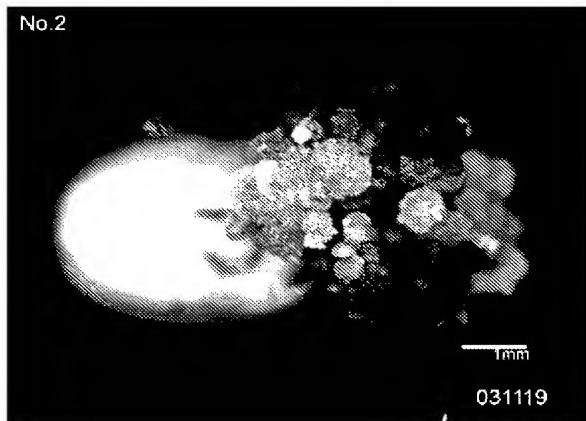
選抜 7 日目の種子の様子



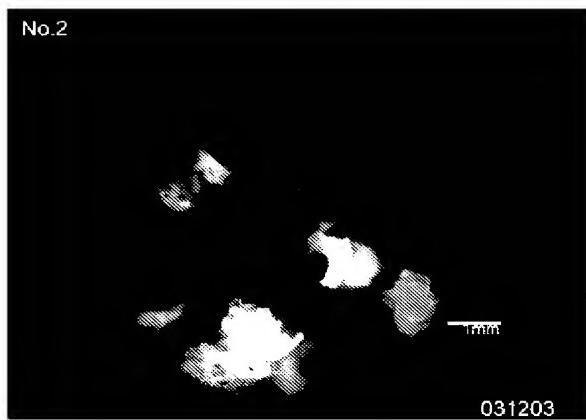
選抜 14 日目 G F P 蛍光の写真



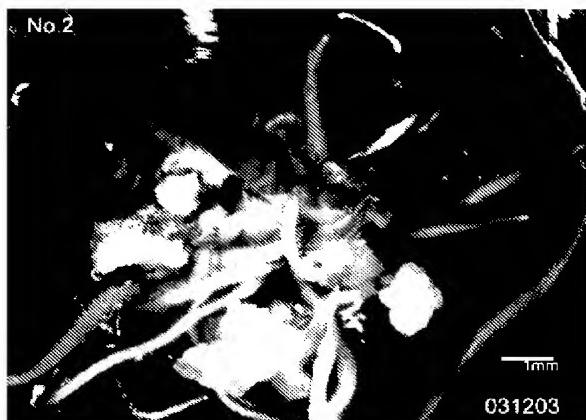
選抜 14 日目の種子の様子



再分化 14 日目 G F P 蛍光の写真

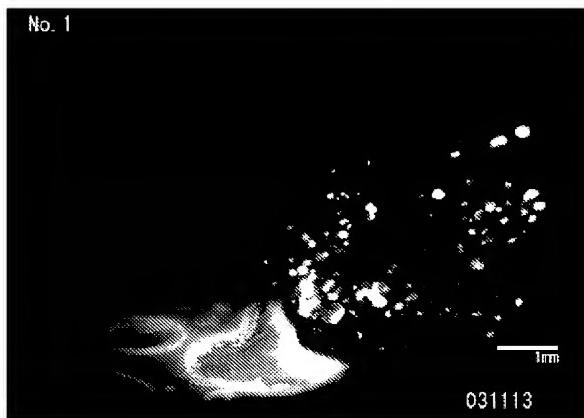


再分化 14 日目の種子の様子



[図4]

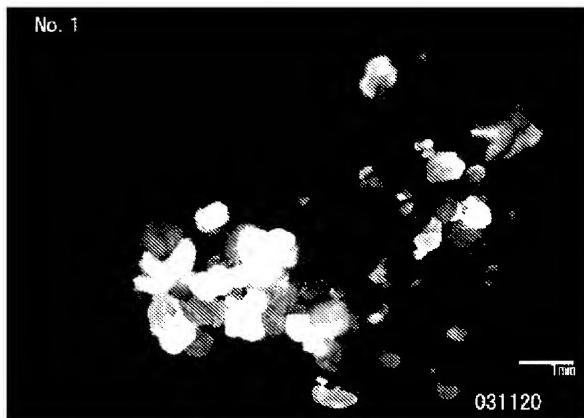
選抜 7 日目 GFP 蛍光の写真



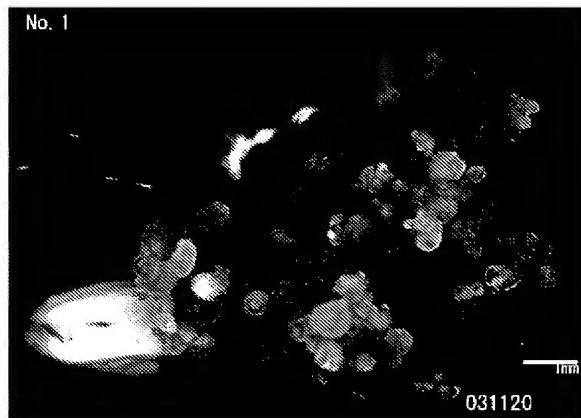
選抜 7 日目の種子の様子



選抜 14 日目 GFP 蛍光の写真



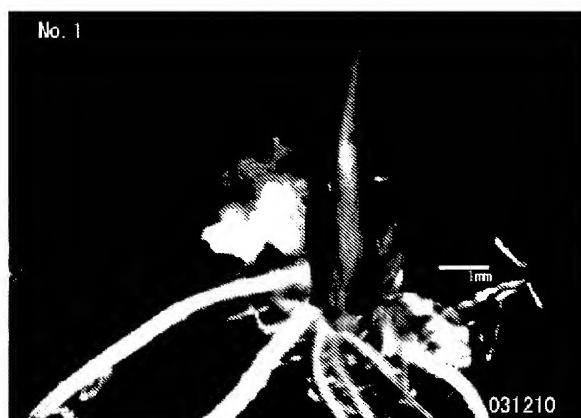
選抜 14 日目の種子の様子



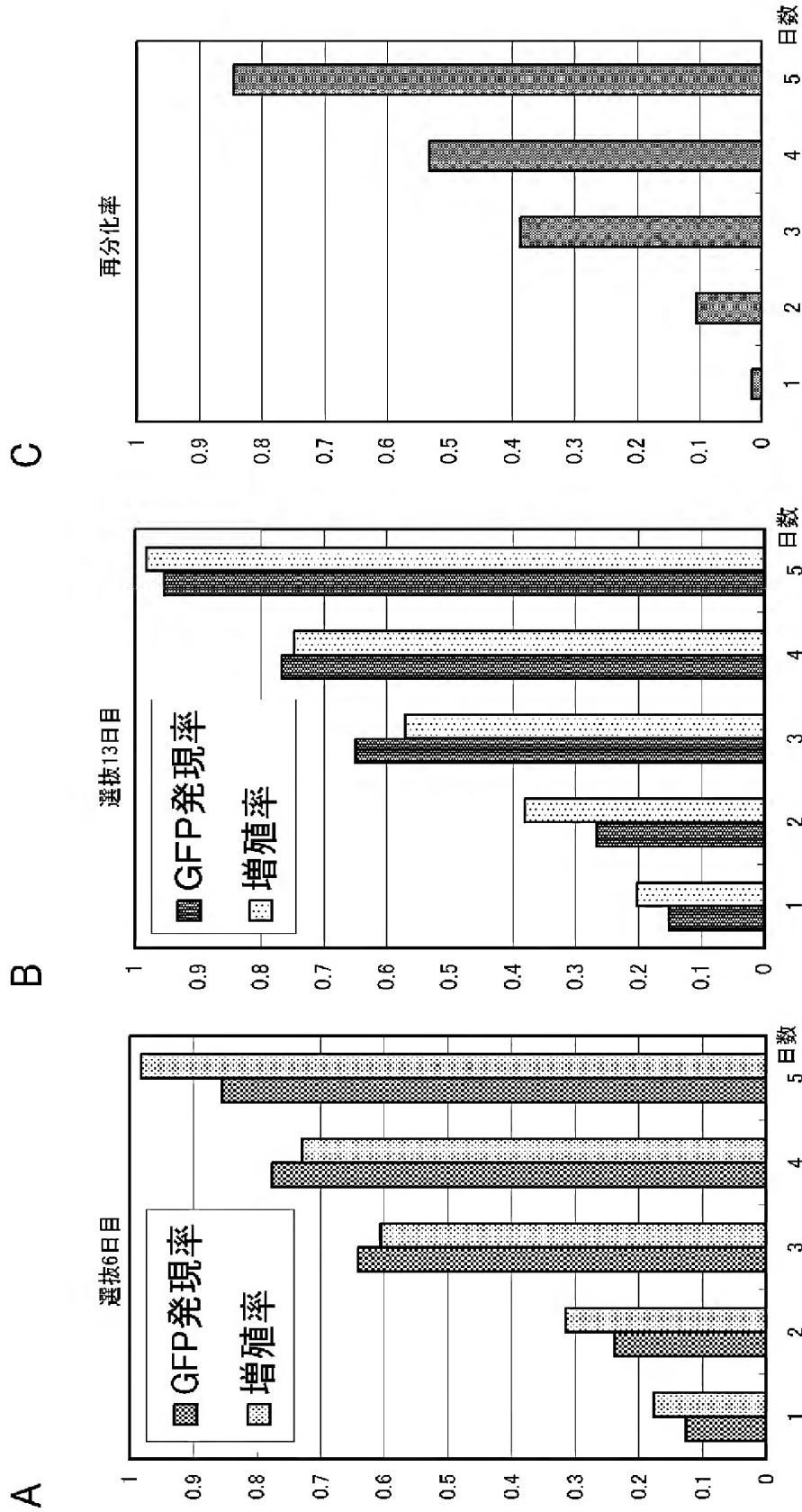
再分化 20 日目 GFP 蛍光の写真



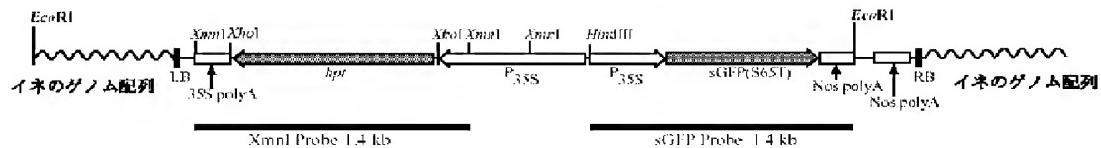
再分化 20 日目の種子の様子



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005592

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ A01H1/00, C12N15/84

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A01H1/00, C12N15/84

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), Medline (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/06844 A1 (Japan as represented by Director General of National Institute of Agrobiological Sciences), 01 February, 2001 (01.02.01), & EP 1198985 A4 & AU 775233 B2 & CA 2366104 A1	1-6
X	JP 3141084 B2 (Director General of National Institute of Agrobiological Sciences), 05 March, 2001 (05.03.01), (Family: none)	1-6

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
13 May, 2005 (13.05.05)Date of mailing of the international search report
31 May, 2005 (31.05.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl.⁷ A01H1/00, C12N15/84

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl.⁷ A01H1/00, C12N15/84

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

WPI(DIALOG)、BIOSIS(DIALOG)、JSTPlus(JOIS)、Medline(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 01/06844 A1 (農林水産省農業生物資源研究所所長が代表する日 本国) 2001.02.01 & EP 1198985 A4 & AU 775233 B2 & CA 2366104 A1	1-6
X	JP 3141084 B2 (農林水産省農業生物資源研究所長) 2001.03.05 (ファミリーなし)	1-6

□ C欄の続きにも文献が列挙されている。

□ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.05.2005

国際調査報告の発送日

31.5.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

田村 明照

4B

3537

電話番号 03-3581-1101 内線 3448